

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

**Delece v mitochondriální DNA v patologii
mitochondriálních onemocnění**

**Mitochondrial DNA deletions in pathology
of mitochondrial disorders**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Jana Buzková
2006

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Markéta Tesařová, PhD.

Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch,

Klinika dětského a dorostového lékařství 1. LF UK a VFN,

Ke Karlovu 2, Praha 2

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury a pod vedením uvedeného školitele.

Jana Blahová

ABSTRAKT

Mitochondriální poruchy představují heterogenní skupinu onemocnění, na jejichž etiologii se podílí dva buněčné genomy, jaderný a mitochondriální. Významnou část těchto poruch tvoří pacienti s delecemi v mitochondriální DNA (mtDNA). Primární mutace v jaderných genech způsobují sekundární ztrátu mtDNA nebo tvorbu delecí vedoucí k dysfunkci příslušné tkáně. Zdá se, že kritickým momentem vzniku delecí je replikace mtDNA, jejíž přesný průběh dosud není znám. Tato onemocnění, která jsou mezi generacemi přenášena Mendelovským typem dědičnosti, se klinicky velmi podobají onemocněním, jejichž příčinou jsou mutace v mtDNA. Nejčastější poruchou spojenou s násobnými delecemi mtDNA je autosomálně dominantní progresivní externí oftalmoplegie (adPEO). Syndrom deplece mtDNA (MDS) je vážné dětské onemocnění, při kterém dochází ke tkáňově specifické ztrátě mtDNA. U pacientů s mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatií (MNGIE) jsou detekovány násobné delece či deplece mtDNA.

Cílem této práce je snaha podat přehled o současných znalostech replikace mtDNA se specifickým zaměřením na faktory ovlivňující vznik delecí v mtDNA u pacientů s mitochondriální poruchou.

Obsah:

1. Úvod	7
2. Struktura a funkce mitochondrií	8
3. Mitochondriální genom	11
3.1. <i>Struktura mitochondriální DNA</i>	11
4. Replikace mitochondriální DNA	13
4.1. <i>Modely replikace</i>	13
4.1.1. <i>Asymetrický model replikace mtDNA</i>	13
4.1.2. <i>Synchronní jednosměrný model replikace mtDNA</i>	14
4.1.3. <i>Synchronní dvousměrný model replikace mtDNA</i>	14
4.2. <i>Proteiny replikační vidličky</i>	16
5. Transkripce mtDNA	20
6. Translace	20
7. Delece v mitochondriální DNA u pacientů s mitochondriálním onemocněním	21
8. Nukleotidový metabolismus a jeho poruchy	23
9. Myší modely mitochondriálních onemocnění	26
9.1. <i>Modely funkce DNA-polymerázy γ</i>	26
9.2. <i>Model funkce mtDNA-helikázy Twinkle</i>	26
9.3. <i>Model funkce ANTI</i>	27
10. Cíle další práce	28
11. Závěr	29
12. Seznam literatury	30

SEZNAM ZKRATEK

ADP	adenosin-5'-difosfát
adPEO	autosomálně dominantní progresivní externí oftalmoplegie
ANT	adeninnukleotidový přenašeč
ANT1	adeninnukleotidový přenašeč 1
CoQ	ubichinon
CoQH	ubisemichinon
CoQH ₂	ubichinol
CPEO	chronická progresivní externí oftalmoplegie
CSB	sekvenčně konzervované bloky
dCK	deoxycytidinkináza
dGK	deoxyguanosinkináza
DNC	deoxynukleotidový přenašeč
dNTP	2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfát
dNT2	5'(3')-deoxyribonukleotidáza
dsDNA	dvouřetězcová DNA
ENT1	rovnovážný nukleosidový přenašeč 1
EOM	extraokulární svaly
HMG	z angl. high mobility group
HSP	promotor těžkého řetězce
IT _{H1}	místo iniciace transkripce těžkého řetězce 1
IT _{H2}	místo iniciace transkripce těžkého řetězce 2
IT _L	místo iniciace transkripce lehkého řetězce
KSS	Kearns-Sayreův syndrom
LM-PCR	ligation-mediated polymerázová řetězová reakce
LSP	promotor lehkého řetězce
MCPHA	mikrocefálie u populace u Amishů
MDS	syndrom deplece mitochondriální DNA
MNGIE	mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatie
mtDNA	mitochondriální DNA
mtSSB proteiny	mitochondriální single-stranded DNA vazebné
mtTERM	mitochondriální terminační faktor
mtTFA	mitochondriální transkripční faktor A

mtTFB1	mitochondriální transkripční faktor B1
mtTFB2	mitochondriální transkripční faktor B2
nDNA	jaderná DNA
O _H	počátek replikace těžkého řetězce
O _L	počátek replikace lehkého řetězce
OXPHOS	system oxidativní fosforylace
PEO	progresivní externí oftalmoplegie
PolG	mitochondriální-DNA-polymeráza γ
PolG- α	katalytická podjednotka mitochondriální-DNA- polymerázy γ
PolG- β	přídavná podjednotka mitochondriální-DNA- polymerázy γ
PS	Pearsonův syndrom
real-time PCR	real-time polymerázová řetězová reakce
ROS	reaktivní kyslíkové radikály
ssDNA	jednořetězcová DNA
TAS	terminačně asociovaná sekvence
TK1	thymidinkináza 1
TK2	thymidinkináza 2
TP	thymidinofosforyláza
UCP	rozpráhující protein
2D-AGE	dvourozměrná agarózová gelová elektroforéza

1. Úvod

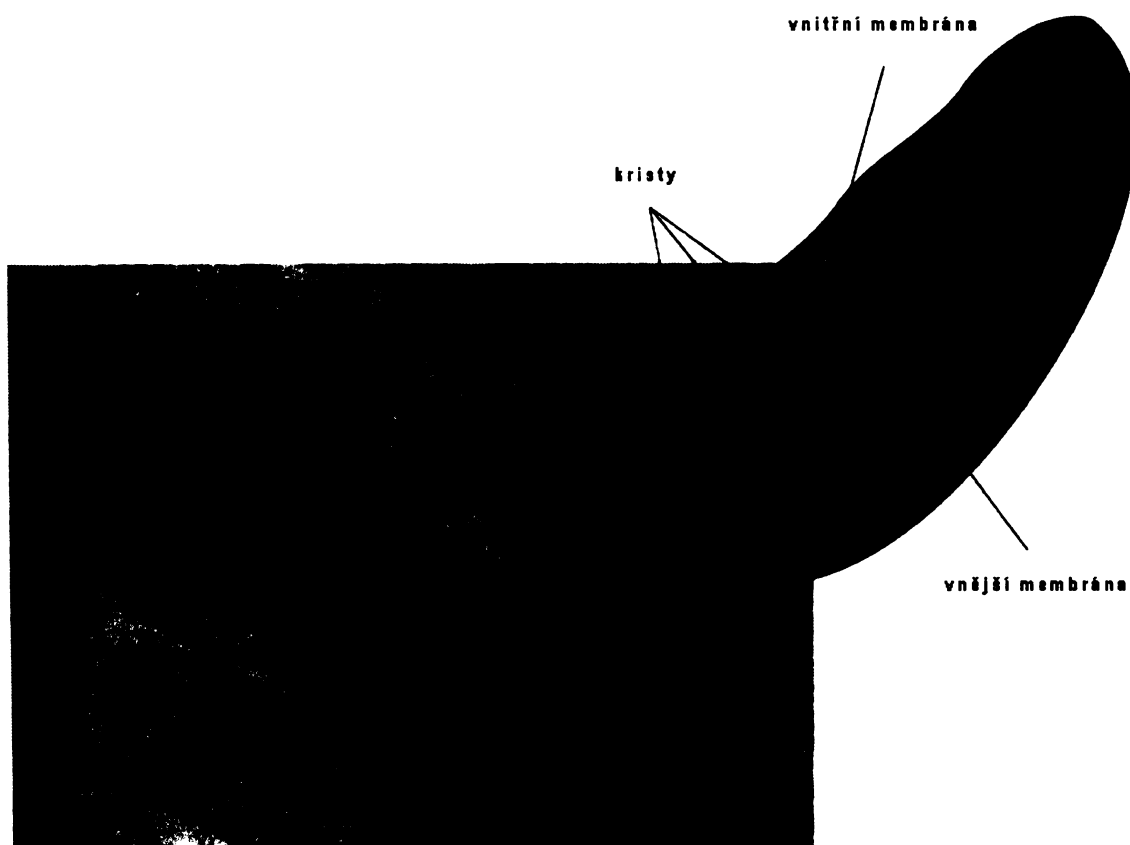
Mitochondrie jsou nezbytnou součástí téměř všech eukaryotních buněk, kde hrají důležitou roli v mnoha buněčných procesech jako je oxidativní fosforylace, aerobní metabolismus glukózy a tuků, signalizace přes vápenaté kationty (Ca^{++}) a apoptóza.

První onemocnění spojené s poruchou mitochondrií bylo popsáno již v roce 1962 R. Luftem u pacienta s hypermetabolismem. V 80. a 90. letech minulého století byly objeveny první patogenní delece a bodové mutace mitochondriální DNA (mtDNA). Dnes je známo více než 100 různých „přestaveb“ mtDNA (jednoduché delece, násobné delece nebo duplikace) a více než 100 bodových mutací mtDNA, které jsou spojovány s mitochondriálními onemocněními. Incidence mitochondriálních onemocnění je odhadována na 1 : 3500 (Schaefer, et al.; 2004).

2. Struktura a funkce mitochondrií

Mitochondrie v buňkách vytvářejí rozsáhlou síť, která je velmi dynamická. Jednotlivé mitochondrie se neustále dělí a fúzí. Nedávno byly nalezeny důkazy, že mitochondrie či mitochondriální DNA se mohou pohybovat i mezi jednotlivými buňkami (Spees, et al.; 2006).

Velikost i tvar mitochondrií se mění v závislosti na potřebách dané buňky. Obecně jsou mitochondrie tvořeny dvěma membránami, vnější propustná membrána obsahuje velké množství porinů umožňující průchod látek o velikosti do 5 kDa. Vnitřní membrána je díky kardiolipinu vysoce nepropustná pro protony, což je základním předpokladem pro chemiosmotickou syntézu ATP. Proteiny tvoří 76 % její hmotnosti (Lodish, et al.; 2002). Membrány oddělují tzv. mezimembránový prostor. Zde jsou uloženy enzymy, které využívají ATP uvolňované z matrix k fosforylaci dalších nukleotidů (viz. obr. 1, 2).



Obr.1.: Mitochondrie – snímek z elektronového mikroskopu. Jsou zde jasně viditelné struktury vnější membrány a křisty vnitřní mitochondriální membrány obklopující mitochondriální matrix. Schématické znázornění struktury mitochondrie (Van de Graaff, et al.; 1997).

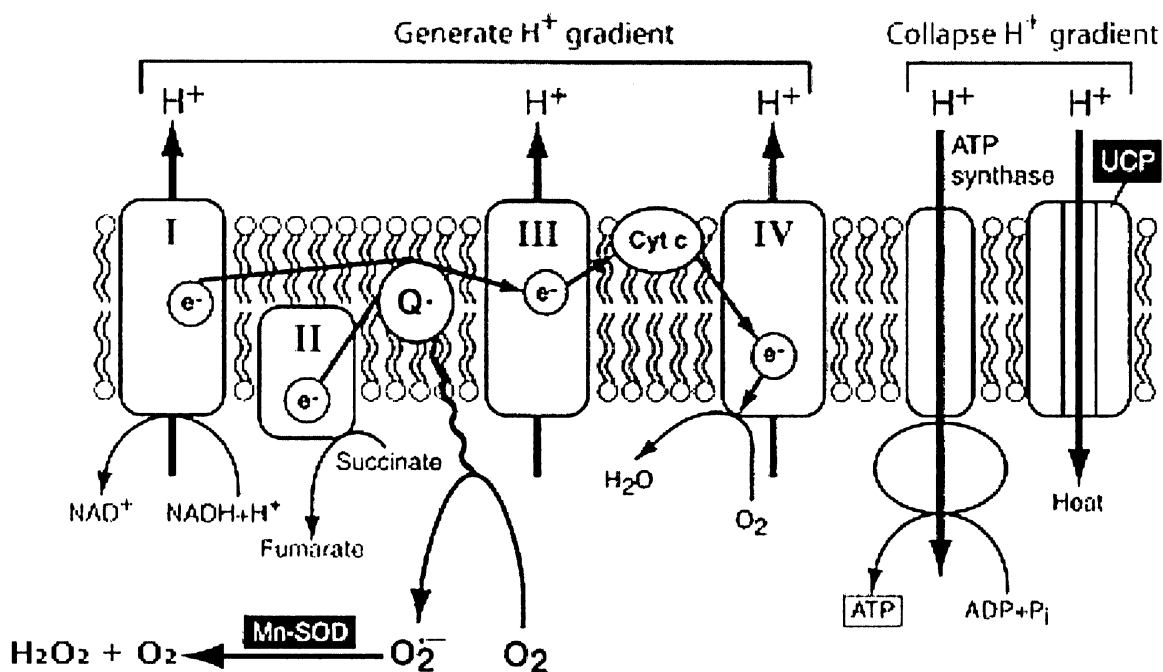
Vnitřní mitochondriální membrána obklopuje prostor, tzv. mitochondriální matrix, kam zasahuje četnými záhyby nazývanými kristy (viz. obr. 1, 2). V matrix je obsažen mitochondriální genom a několik set jaderně kódovaných proteinů, zajišťujících řadu metabolických drah (Krebsův cyklus, β -oxidaci, syntézu hemu a část cyklu urey atd.) a expresi mitochondriálních genů.



Obr.2.: Trojrozměrný model mitochondrie vytvořený pomocí elektronové tomografie, vnější mitochondriální membrána - tmavá modrá, vnitřní mitochondriální membrána – světle modrá, kristy – žlutá (Frey, et al.; 2002).

Jednou z nejdůležitějších funkcí mitochondrií je tvorba makroergních sloučenin. V mitochondriích vzniká až 95 % veškerého ATP v buňce, které je zdrojem energie téměř pro všechny biologické děje. ATP vzniká v systému oxidativní fosforylace (OXPHOS) ve vnitřní mitochondriální membráně (viz. obr. 3). Redukční ekvivalenty (NADH a FADH_2) se uvolňují při odbourávání pyruvátu Krebsovým cyklem a při β -oxidaci mastných kyselin. Elektrony z NADH a FADH_2 vstupují přímo do dýchacího řetězce. NADH předává elektrony komplexu I (NADH: ubichinon-oxidoreduktáza) skládající se ze 46 podjednotek (Carroll, et al.; 2003). Elektrony z FADH_2 jsou přeneseny na komplex II (sukcinát: ubichinon-oxidoreduktáza), který je tvořen 4 podjednotkami. Oba komplexy přenášejí elektrony na ubichinon (CoQ) za vzniku ubisemichinonu (CoQH) a následně ubichinolu (CoQH_2). Z ubichinolu jsou elektrony přeneseny na komplex III (ubichinol: ferocytochrom-c-oxidoreduktáza), skládající se z 11 podjednotek. Přes cytochrom c jsou elektrony přeneseny na komplex IV (ferocytochrom-c:

O_2 -oxidoreduktáza, cytochrom-c-oxidáza), který je tvořen 13 podjednotkami. Konečným akceptorem elektronů je molekula kyslíku (O_2), jehož redukcí vzniká voda. Všechny komplexy dýchacího řetězce (kromě komplexu II) fungují jako protonové pumpy a využívají energii uvolněnou během transportu elektronů k pumpování protonů (H^+) z matrix do mezimembránového prostoru. Tím dochází na vnitřní mitochondriální membráně ke vzniku elektrochemického gradientu, který je využit komplexem V (F_1F_0 -ATP syntáza) jako zdroj energie k syntéze ATP z ADP a anorganického fosfátu (P_i) (viz. obr. 3). ATP je z mitochondrií uvolňováno antiportem s ADP přes adeninnukleotidový přenašeč (ANT).



Obr.3.: Schéma elektrontransportního řetězce ve vnitřní mitochondriální membráně a místa vzniku reaktivních kyslíkových radikálů. UCP – rozpřahující protein (z anglického uncoupling protein). Zdroj: www.medscape.com

3. Mitochondriální genom

Každá buňka obsahuje stovky až tisíce kopií mtDNA, které jsou během buněčného dělení náhodně distribuovány do dceřinných buněk. Oproti jadernému genomu se liší v několika znacích. Velikost mtDNA je přibližně 16,6 kbp. Na rozdíl od jaderného genomu je mtDNA kruhová molekula tvořená dvěma antiparalelními řetězci, které nejsou natáčeny na histonové oligomery. Společně s proteiny mitochondriální matrix a vnitřní mitochondriální membrány tvoří DNA – proteinové komplexy označované mitochondriální nukleoidy (Chen and Butow; 2005).

Další specifitou je maternální dědičnost mtDNA. Všechna mtDNA pochází z vajíčka, jelikož mitochondrie přinesené do vajíčka spermií jsou cíleně degradovány. MtDNA podléhá i vyšší mutagenезi, ale zda je příčinnou produkce reaktivních kyslíkových radikálů u vnitřní mitochondriální membrány, dosud nebylo potvrzeno.

Nalézá-li se v buňce homogenní populace mtDNA molekul, označujeme tento stav jako homoplazmie. Pokud se v buňkách nalézají jak populace normálních mtDNA, tak mutovaných mtDNA molekul, hovoříme o heteroplazmii. Poměr mezi mutovanými a nemutovanými kopiemi mtDNA určuje mitochondriální genotyp a pohybuje se v rozmezí 1 – 100 %. Biologický stav buňky se změní v situaci, kdy počet mutovaných kopií přesáhne prahovou hodnotu (threshold). Podle počtu postižených buněk dochází k postižení tkání nebo celého organismu. Fenotypová prahová hodnota pro delece mtDNA je 60 %, pro ostatní mutace mtDNA přibližně 90 % (Rossignol, et al.; 2003).

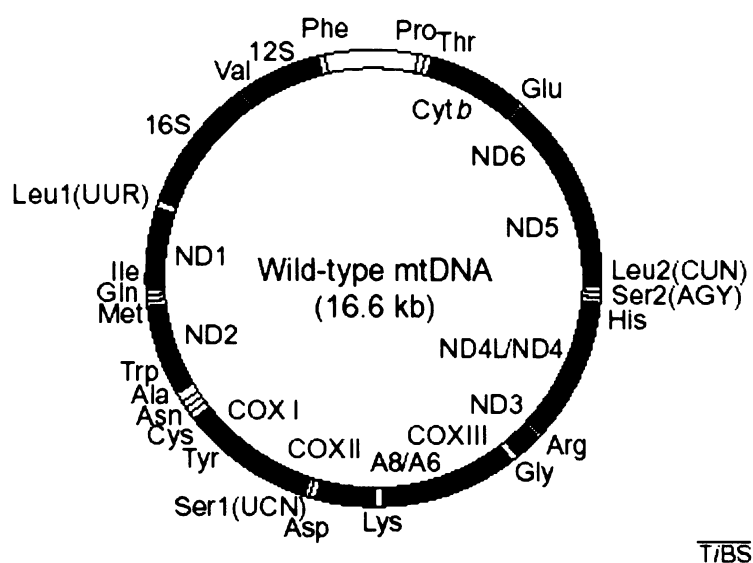
3.1. Struktura mitochondriální DNA

Sekvence lidské mitochondriální DNA byla poprvé zjištěna v roce 1981 (Anderson, et al.; 1981). V denaturujícím cesiumchloridovém gradientu lze jednotlivé řetězce navzájem oddělit na základě různého obsahu G + T. Název těžký řetězec (H-řetězec) je odvozen od vysokého obsahu guaninu narozdíl od lehkého řetězce (L-řetězec), kde je vyšší podíl cytosinu (Kasamatsu and Vinograd; 1974).

MtDNA kóduje celkem 37 genů, z nichž většina se nachází na těžkém řetězci (viz. obr. 4). Na těžkém řetězci jsou to geny pro malou (12S) a velkou (16S) rRNA, 14 genů pro tRNA a 12 genů pro proteiny oxidativní fosforylace (*MT-ND1*, *MT-ND2*, *MT-ND3*, *MT-ND4*, *MT-ND5* – podjednotky komplexu I; *CYT B* – podjednotka komplexu III; *MT-CO1*, *MT-CO2*, *MT-CO3* – podjednotky komplexu IV a *MT-ATP6*, *MT-ATP8* – podjednotky komplexu V). Lehký řetězec kóduje 8 tRNA a *MT-ND6* podjednotku komplexu I. Ostatní proteiny

komplexů oxidativní fosforylace, všechny proteiny mtDNA exprese a její regulace jsou kódovány jaderným genomem, syntetizovány na cytosolických ribosomech a přes specifické přenašeče transportovány do mitochondrií (Wallace; 1999).

Geny postrádají introny a chybí i většina intergenových sekvencí. Geny pro proteiny jsou od sebe navzájem odděleny krátkými rRNA nebo tRNA sekvencemi (většina terminačních kodónů není kódována a jsou vytvářeny až posttranskripčně) (Ojala, et al.; 1981).



Obr.4.: Mapa lidského mitochondriálního genomu. Geny kódující polypeptidy jsou uvnitř kruhu. Geny pro rRNA a tRNA jsou vně (Schon; 2000).

Jedinou nekódující oblastí mtDNA je D-smyčka (z anglického displacement loop) (Kasamatsu and Vinograd; 1974), lokalizována mezi geny pro tRNA^{Phe} a tRNA^{Pro} (Walberg and Clayton; 1981). D-smyčku tvoří krátký řetězec nukleových kyselin, který je komplementární k lehkému řetězci a vytlačuje těžký řetězec ze struktury duplexu. V této oblasti se také nachází několik elementů významných pro iniciaci replikace a transkripce (promotor lehkého LSP i těžkého řetězce HSP, sekvenčně konzervované bloky CSB, místa iniciace transkripce lehkého IT_L i těžkého řetězce IT_{H1}, počátek replikace těžkého řetězce O_H).

4. Replikace mitochondriální DNA

4.1. Modely replikace

Po mnoho let byl jediným uznávaným modelem pro replikaci mtDNA Claytonův asymetrický model (Clayton; 1982), odvozený na základě snímků mtDNA kultivovaných buněk z elektronového mikroskopu. Tento model je v posledních letech nahrazován alternativními modely replikace, které jsou založeny na analýze replikačních meziproduktů pomocí dvourozměrné agarózové gelové elektroforézy (2D-AGE) (Bowmaker, et al.; 2003, Holt, et al.; 2000), jejíž průkopníky jsou Brewer a Fangman (Brewer and Fangman; 1988). Touto technikou lze oddělit DNA molekuly na základě jejich velikosti a tvaru.

Pro průběh replikace mtDNA byly zatím navrženy 3 modely:

- Asymetrický model (Clayton; 1982)
- Synchronní jednosměrný model (Holt, et al.; 2000)
- Synchronní dvousměrný model (Bowmaker, et al.; 2003).

4.1.1. Asymetrický model replikace mtDNA

Asymetrický model replikace savčí mtDNA byl navržen již v roce 1982 C. A. Claytonem. Během následujících 20 let byl model v klíčových bodech upřesňován.

Replikace začíná syntézou krátkých mitochondriálních transkriptů RNA-polymerázou, které slouží jako primery pro iniciaci syntézy těžkého řetězce (Chang, et al.; 1985). RNA transkripty jsou v místě O_H štěpeny mitochondriální RNA-endonukleázou (RNaza MRP) za vzniku volného 3'- konce pro mitochondriální-DNA-polymerázu γ (PolG) (Lee and Clayton; 1997). Syntéza těžkého řetězce je ve velkém množství případů ukončena na terminačně asociované sekvenci (TAS) přibližně 50 nukleotidů od O_H (Shadel; 1999). Tímto krátkým řetězcem poté vzniká triplexová struktura D-smyčky (Clayton; 1982).

Replikační počátek lehkého řetězce je lokalizován v nekódující oblasti o velikosti 30 nukleotidů, která je ohraničena geny pro pět tRNA (Tapper and Clayton; 1981). Jak replikace pokračuje časné replikační meziprodukty vytlačují rodičovský těžký řetězec z mtDNA duplexu. Syntéza opožděujícího (lehkého) řetězce začíná až po odhalení jednořetězcové formy O_L přibližně ve 2/3 kruhové mtDNA postupující replikační vidličkou. Replikace toho řetězce potom běží kontinuálně opačným směrem. Lehký řetězec je dokončen po dokončení a oddělení těžkého řetězce (Taanman; 1999) (viz. obr. 5B).

Důležitým aspektem asymetrického modelu je, že syntéza obou řetězců probíhá kontinuálně bez přerušování Okazakiho fragmenty. Primery v oblasti počátků replikace jsou odstraňovány RNázou H (Bogenhagen and Clayton; 2003).

4.1.2. Synchronní jednosměrný model replikace mtDNA

V roce 2000 zveřejnil Holt a kolektiv nový model replikace mtDNA odvozený na základě pozorování replikačních meziproduktů 2D-agarózovou elektroforézou (Holt, et al.; 2000).

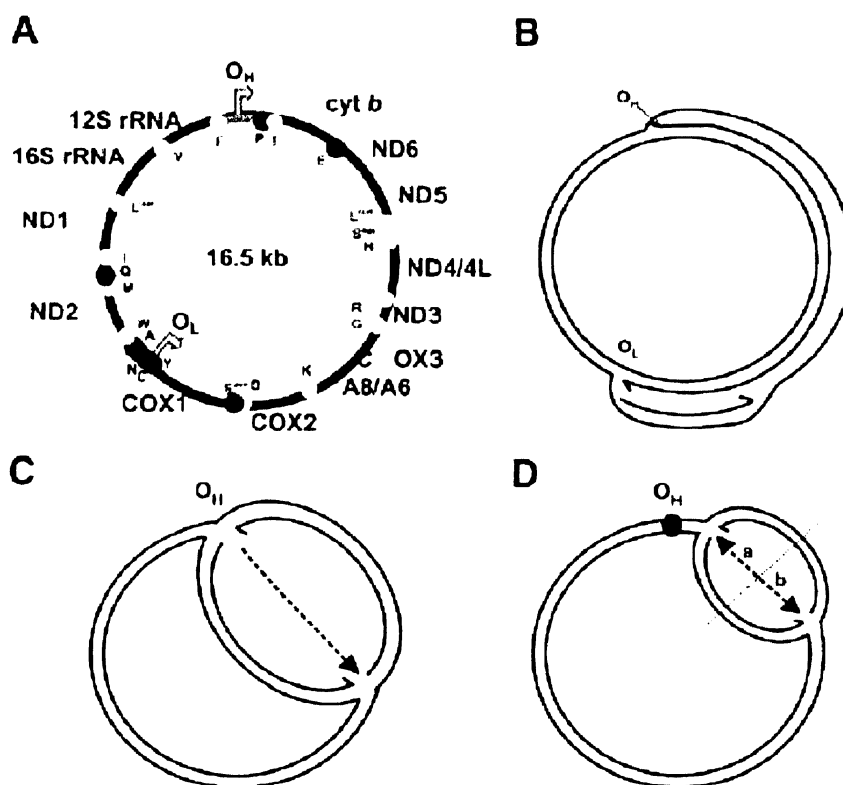
Syntéza mtDNA začínající přímo v O_H nebo v jeho blízkosti probíhá jedním směrem po celé délce molekuly mtDNA. Buňky, ve kterých bylo nejprve pomocí inhibitorů replikace sníženo množství mtDNA, byly srovnány s normálně rostoucími buňkami. Z buněk, kde docházelo k reamplifikaci, byly izolovány pouze dvouřetězcové meziprodukty rezistentní k endonukleázám štěpící ssDNA úseky. Naopak z buněk, kde docházelo pouze k uchování mtDNA, byly izolovány jednořetězcové meziprodukty citlivé na endonukleázy štěpící ssDNA úseky. Tyto důkazy svědčily o tom, že různé modely replikace mtDNA operují v lidských buňkách za různých podmínek (Holt, et al.; 2000) (viz. obr. 5C).

4.1.3. Synchronní dvousměrný model replikace mtDNA

V roce 2003 navrhla skupina I. J. Holta model synchronní dvousměrné replikace mtDNA (Bowmaker, et al.; 2003) na základě další analýzy replikačních meziproduktů 2D-agarózovou elektroforézou lidských, myších a krysích vysoce purifikovaných mitochondrií.

V tomto modelu probíhá syntéza obou řetězců současně a je iniciována z jednoho či více míst v protisměru (downstream) od O_H . Iniciační místa jsou lokalizována do oblasti 4 – 6 kbp, která zahrnuje geny pro cytochrom b a podjednotky 5 a 6 NADH-dehydrogenázy, tedy v protisměru (downstream) od 3'- konce D-smyčky (viz. obr. 5D).

Hlavní funkcí O_H není počátek replikace, ale naopak terminace replikace mtDNA, dále pak replikace probíhá jen v jediném směru a nelze ji odlišit od synchronní jednosměrné replikace. Fakt, že replikace nikdy nepřekročí O_H , tedy nezasáhne do ribosomálních DNA genů, naznačuje, že jsou v tomto místě blokovány všechny replikační vidličky. Důkazem je i neschopnost mtDNA-helikázy odvíjet RNA-DNA hybridy vytvořené krátkým D-primerem. Topologickými změnami struktury mtDNA D-smyčka stanovuje podmínky, za kterých může dojít k iniciaci replikace z oblasti, kde jsou lokalizována iniciační místa.



Obr.5.: **Savčí mitochondriální genom a modely replikace mtDNA** A) savčí mitochondriální genom; B) asymetrický model replikace mtDNA; C) synchronní jednosměrný model replikace mtDNA; D) synchronní dvousměrný model replikace mtDNA (Bowmaker, et al.; 2003).

Přesný mechanismus replikace mtDNA není dodnes znám. V roce 2003 D. F. Bogenhagen a D. A. Clayton publikovali v časopise Trends in Biochemical Sciences článek (Bogenhagen and Clayton; 2003), ve kterém diskutovali model navržený I. J. Holtem (Holt, et al.; 2000) a M. Y. Yangem (Yang, et al.; 2002) a předkládali nové důkazy pro asymetrický model replikace mtDNA. Objev hlavního replikačního počátku, ze kterého vznikají nové řetězce při stabilním obsahu mtDNA, představila v roce 2004 J. Fish a kolektiv (Fish, et al.; 2004). Tento počátek je lokalizován na pozici 57 uvnitř D-smyčky několika lidských buněčných linií. Další důkazy pro asymetrický model představil v roce 2005 T. A. Brown a kolektiv, kteří testovali replikační meziprodukty mtDNA z myších jater pomocí „atomic force mikroskopie“ a 2D-agarózové elektroforézy (Brown, et al.; 2005).

Skupina, která navrhla synchronní jednosměrný model, ho v roce 2002 potvrdila (Yang, et al.; 2002). Z vysoce purifikovaných mitochondrií získali replikační meziprodukty obsahující RNA-DNA hybridy, kde RNA původně sloužily jako primery pro syntézu lehkého řetězce. Vznik jednořetězcových úseků během asymetrické replikace vysvětlili poškozením RNázou H během mtDNA extrakce.

Další důkazy podporující synchronní dvousměrný model byly publikovány skupinou I. J. Holta v roce 2005 (Yasukawa, et al.; 2005). Mitochondriální replikační meziprodukty kultivovaných lidských buněk a buněk pevných tkání analyzovali 2D-agarózovou elektroforézou a „ligation-mediated polymerázovou řetězovou reakcí“ (LM PCR). Žádný z těchto pokusů nepotvrdil asymetrický model replikace, ale lokalizace potenciální replikačních počátků do dvou oblastí potvrdila synchronní dvousměrný model. Dále se domnívají, že replikační počátek těžkého řetězce v pozici 54 navržený v roce 2004 (Fish, et al.; 2004), je sice hlavním replikačním počátkem nikoli však asymetrického, ale synchronního dvousměrného modelu.

4.2. Proteiny replikační vidličky

Pro správný průběh replikace mtDNA je nutná přítomnost proteinů, transkripčních faktorů a dalších enzymů. Složení replikační vidličky se potom liší podle daného replikačního modelu. V asymetrickém modelu fungují základní enzymy jako DNA-polymeráza γ , mtDNA-helikáza, mtSSB proteiny (mitochondrial single-stranded DNA-binding proteins), mtDNA-topoizomeráza, mtTFA (mitochondriální transkripční faktor A) a mtDNA primáza/RNA-polymeráza, RNáza H1. Pro oba synchronní modely jsou nutné všechny základní proteiny, ale navíc jsou zde potřeba enzymy pro iniciaci a zpracování Okazakiho fragmentů na opožděujícím se řetězci.

- **Mitochondriální-DNA-polymeráza γ (PolG)**

V živočišných mitochondriích byla dosud nalezena pouze jediná DNA-polymeráza – polymeráza γ . Tento jaderně kódovaný protein funguje jako heterotrimer, skládající se z 1 katalytické podjednotky a homodimeru přídatné podjednotky (Carrodeguas, et al.; 2001). Katalytická podjednotka PolG- α má velikost polypeptidu 120 – 140 kDa (Olson, et al.; 1995). Tři konzervované polymerázové motivy jsou lokalizovány v blízkosti C konce a tři konzervované exonukleázové motivy u N konce (Lewis, et al.; 1996). Mezi nimi se nachází tzv. spojnicová oblast. Třetí katalytickou aktivitou je 5'-deoxyribózafofosfátlyáza. PolG je společně s DNA-glykozylázou a AP-endonukleázou součástí opravného mechanismu mtDNA (Longley, et al.; 1998). Přídatná podjednotka PolG- β funguje jako homodimer, který stimuluje polymerázovou a exonukleázovou aktivitu a zvyšuje procesivitu enzymu. Jednotlivé monomery PolG- β obsahují 3 různé domény (Carrodeguas, et al.; 2001). Důležitá je zejména

doména 3, přes kterou se homodimer váže na spojníkovou oblast katalytické podjednotky (Fan and Kaguni; 2001).

- **Mitochondriální-DNA-helikáza Twinkle**

Gen Twinkle (podle HUGO nomenklatury PEO1), lokalizovaný na lidském chromozomu 10, kóduje ATP-dependentní-mtDNA-helikázu, která vykazuje výraznou homologii s C koncem bakteriofágového T7 genu, T7 gen 4 helikáza-primáza. Lidský gen Twinkle obsahuje 5 helikázových sekvenčních motivů, stejně jako T7 gen, ale postrádá primázové sekvence. Helikáza Twinkle funguje ve formě hexamerů, které jsou součástí mitochondriálních nukleoidů (Spelbrink, et al.; 2001). Odvíjení dsDNA v replikační vidličce Twinkle helikázou je stimulováno mtSSB proteiny, což přispívá ke zvýšení syntézy DNA (Korhonen, et al.; 2003). Snížení exprese genu Twinkle vede ke snížení počtu kopií mtDNA v kultivovaných lidských buňkách. Twinkle helikáza hraje důležitou roli při údržbě mtDNA a je esenciální pro regulaci počtu kopií mtDNA u savců (Tynismaa, et al.; 2004).

- **Mitochondriální SSB proteiny** (mitochondrial single-stranded DNA-binding proteins)

MtSSB proteiny hrají důležitou roli v replikaci, opravě a rekombinaci mtDNA. Zvyšují helixovou nestabilitu vytvořenou DNA helikázou, stimulují aktivitu DNA polymerázy a zvyšují produkci a přesnost nukleotidové polymerace. Velikost izolovaných mtSSB proteinů se nachází v rozmezí od 13 do 16 kDa (Tiranti, et al.; 1993). V roztoku se mtSSB proteiny nacházejí v přirozené tetramerní formě o molekulové hmotnosti 56 kDa (Li and Williams; 1997). Tetramery mtSSB proteinů mají vysokou afinitu k DNA, na kterou se prostřednictvím elektropozitivních smyček společně váží (Yang, et al.; 1997). Vazebné místo každého protomeru zahrnuje 8 – 17 nukleotidů řetězce DNA (Thommes, et al.; 1995).

- **Mitochondriální-DNA-topoizomeráza**

Lidská mitochondriální topoizomeráza I je 72 kDa protein, který uvolňuje nejen negativní ale pravděpodobně i pozitivní nadobrátky vytvořené helikázovou aktivitou (Zhang, et al.; 2001). Lidský gen TOP3 α kódující DNA-topoizomerázu III α , má 2 potenciální start kodóny. Jeden z nich dává vznik N koncové sekvenci fungující jako mitochondriální cílový signál. Přítomnost tohoto enzymu byla dokázána v mitochondriích HeLa buněk (Wang, et al.; 2002).

- **Mitochondriální transkripční faktor A (mtTFA)**

Mitochondriální transkripční faktor A patří do skupiny proteinů, obsahující dvě DNA vazebné domény - HMG boxy, je nutný pro přesné a účinné rozpoznání promotoru RNA-polymerázou (Dairaghi, et al.; 1995). Tento faktor se váže na konzervované regulační sekvence uvnitř D-smyčky, kam navádí další faktory (mtTFB1, mtTFB2) (Ghivizzani, et al.; 1994). Snížená produkce mtTFA vede ke snížení množství mtDNA (Larsson, et al.; 1998). Jelikož je množství mtTFA v normálních buňkách výrazně vyšší než je množství potřebné pro transkripci, byl vytvořen model, kde mtTFA má funkci histonů a poskytuje tak ochranu mitochondriálnímu genomu (Ghivizzani, et al.; 1994).

- **Mitochondriální-DNA-primáza/ RNA-polymeráza**

Lidská mitochondriální DNA primáza byla předpovězena (Wong and Clayton; 1985a), ale doposud její existence nebyla potvrzena a ani nebyly identifikovány žádné geny. S větší pravděpodobností syntetizuje RNA primer RNA-polymeráza a to jako dlouhý RNA transkript (Shadel; 1999). Dále bylo zjištěno, že katalytické jádro mtRNA-polymerázy syntetizuje krátké RNA s malou sekvenční specifitou (Kelly and Lehman; 1986). Je tedy pravděpodobné, že mtRNA-polymeráza nese důležitou roli v iniciaci syntézy opožďujícího se řetězce (Kaguni; 2004).

- **RNáza H1**

RNáza H1 je převážně lokalizována v buněčném jádře. Zlomek těchto proteinů byl nalezen i v mitochondriích, kde má pravděpodobně důležitou roli v uvolňování RNA primerů z počátků replikace lehkého i těžkého řetězce. U synchronních modelů mtDNA replikace pravděpodobně katalyzuje uvolňování RNA primerů během syntézy Okazakiho fragmentů. (Cerritelli, et al.; 2003).

- **RNáza MRP**

Mitochondriální-RNA-endonukleáza je ribonukleoprotein (Shadel and Clayton; 1997), který je ve větším množství přítomen v jádře, kde má důležitou roli v maturaci jaderných rRNA (Lygerou, et al.; 1996). Na základě *in situ* hybridizace byla její přítomnost prokázána i v mitochondriích, kde katalyzuje štěpení RNA primerů při replikaci mtDNA (asymetrický model) (Li, et al.; 1994).

- **Mitochondriální-DNA-ligáza**

Mitochondriální-DNA-ligáza spolupracuje s PolG při dokončování syntézy opožděujícího se řetězce a během oprav mtDNA (Pinz and Bogenhagen; 1998). V buňkách, ve kterých je snižená exprese mtDNA ligázy, dochází k redukci obsahu mtDNA a vzniku mnohočetných jednořetězcových přerušení. To dokazuje potřebu mtDNA-ligázy při replikaci a opravě mtDNA (Lakshmiathy and Campbell; 2001).

5. Transkripce mtDNA

Transkripce genů kódovaných mtDNA je iniciována ze tří hlavních transkripčních míst. Iniclace transkripce krátkého polycistronu těžkého řetězce začíná z IT_{H1} vzdáleného asi 150 bp od IT_L , ze kterého je realizována transkripce lehkého řetězce (Montoya, et al.; 1982). Obě iniciační místa leží uvnitř příslušných promotorů, kterým předcházejí vhodné enhancery nutné pro optimální transkripci. Do těchto míst se následně váží i jednotlivé transkripční faktory (mtTFA). Místo iniciace transkripce dlouhého polycistronu těžkého řetězce IT_{H2} je lokalizováno mezi geny pro tRNA^{Phe} a 12S rRNA.

Hlavním transkripčním enzymem je mitochondriální RNA-polymeráza, s níž interagují transkripční faktory - mtTFA, mtTFB1 a mtTFB2.

Krátký polycistron těžkého řetězce kódující pouze 2 rRNA a 2 tRNA vzniká 25x častěji než dlouhý polycistron kódující téměř celý těžký řetězec. To zajišťuje dostatečné množství rRNA pro mitochondriální ribosomy (Montoya, et al.; 1983). Lehký řetězec je transkribován jako samostatný polycistronní prekurzor obsahující veškerou genetickou informaci tohoto řetězce (Murphy, et al.; 1975). Terminační faktor (mtTERM (Hess, et al.; 1991)) svou vazbou do oblasti genu pro tRNA^{Lcu} vytvoří bariéru, kterou RNA polymeráza není schopna překonat a dojde k atenuaci transkripce krátkého polycistronu těžkého řetězce (Kruse, et al.; 1989).

6. Translace

Překlad mitochondriální genů je v mnoha ohledech velmi specifický. Mitochondrie využívají zjednodušený a modifikovaný genetický kód. Savčí mitochondriální ribosomy (mitoribosomy) lokalizované v mitochondriální matrix jsou tvořeny 12S rRNA a 16S rRNA a velkým množstvím jaderně kódovaných proteinů. Mitochondriální rRNA i tRNA jsou velmi malé a mitochondriální mRNA neobsahují žádné vedoucí sekvence ani 7-methylguanoinovou čepičku pro usnadnění rozpoznání mitoribosomy (Grohmann, et al.; 1978). Postrádají i nepřekládané oblasti na 5'- a 3'- koncích. Malá efektivita překladu mitochondriálních mRNA (Cantatore, et al.; 1987) je pravděpodobně příčinou jejich velké nadprodukce (Taanman; 1999).

7. Delece v mitochondriální DNA u pacientů s mitochondriálním onemocněním

Mitochondriální poruchy představují klinicky, biochemicky i geneticky velmi heterogenní skupinu onemocnění, která se významně podílí na nemocnosti dětí i dospělých. Příčinnou těchto onemocnění mohou být poruchy v mitochondriálním i jaderném genomu. Mutace v mtDNA vedou k onemocněním s maternální dědičností, zatímco mutace v jaderné DNA (nDNA) mohou být přenášeny jako autosomálně dominantní, autosomálně recesivní nebo X-vázané poruchy. U řady mitochondriálně podmíněných onemocnění s autosomální dědičností jsou ve tkáních postižených pacientů nalezeny různě deletované molekuly mtDNA, což naznačuje, že delece mtDNA jsou spíše následkem než příčinou primární patologie.

Náhodně deletované molekuly mtDNA vznikají i během přirozeného stárnutí organismu, ale dosud není úplně známo jak k tomuto jevu dochází. Od roku 1988 bylo nalezeno více než 200 různých delecí s heteroplazmií (80 %) v poškozené tkáni u pacientů s progresivní externí oftalmoplegií (PEO), Kearns-Sayreovým syndromem (KSS) a Pearsonovým syndromem (PS) (Servidei; 2003). Jednoduché delece jsou příčinou asi 1/3 z nich (Chinnery, et al.; 2000).

Delece lze třídit do 3 základních skupin:

- I. skupina: delece jsou ohraničeny dvěma krátkými přímými repeticemi, přičemž jedna je během delečního procesu odstraněna, tvoří 60 % případů;
- II. skupina: delece ohraničené neúplnými repeticemi tvoří 30 % případů;
- III. skupina: delece nejsou ohraničeny žádnými repeticemi, tvoří 10 % případů (Mita, et al.; 1990).

Nejčastější „přestavbou“ mtDNA je „častá“ delece (z anglického „common deletion“) patřící do I. skupiny. Tato delece má velikost 4977 bp a rozkládá se od nukleotidové pozice 8470 (uvnitř genu MT-ATP8) do pozice 13447 (uvnitř genu MT-ND5) (Moraes, et al.; 1989). Je ohraničena dvěma neobvykle dlouhými (13bp) přímými repeticemi, které jsou pravděpodobně příčinou vysoké frekvence vzniku této delecce (Samuels, et al.; 2004). „Častá“ delece se nejčastěji vyskytuje u pacientů s PEO, KSS a PS (Solano, et al.; 2003).

Možný vznik „časté“ delecce (podle Samuelse, et al.; 2004):

- I. fáze: Při replikaci mtDNA dojde v oblasti replikační bubliny k odhalení jednořetězcové 13-bp repetice a to pravděpodobně díky časovému zpoždění mezi syntézou lehkého a těžkého řetězce a ligací Okazakiho fragmentů (Clayton; 1982). Tato jednořetězcová 13-bp repetice je potom volná pro spojení s 5' 13-bp repeticí. Tím

vzniká 5'-dvouřetězcová repetice, která je velmi stabilní. K tomuto kroku může dojít při asymetrické i synchronní replikaci mtDNA.

II. fáze: Pár 13-bp repetice, které ohraničují „častou“ delecí, jsou primárně zodpovědné za spojení 3' a 5' komponent. Konečný deleční zlom je vymezen na lokální úrovni, protože kratší přímé repetice ovlivňují hledání termodynamické stability tohoto bodu (Samuels, et al.; 2004).

Jelikož ke vzniku „přestaveb“ dochází během replikace mtDNA, jsou za jejich vznik zodpovědné jaderně kódované enzymy účastníci se tohoto procesu. Mutace v PolG vedou ke zvýšené frekvenci bodových mutací a vzniku delecí v mtDNA, které jsou totožné s delecemi, jejichž příčinou jsou mutace v genu pro mtDNA-helikázu Twinkle. To naznačuje i stejný mechanismus jejich vzniku (Wanrooij, et al.; 2004). Dřívější návrhy předpokládaly, že za vznik delecí může snížená aktivita těchto enzymů, způsobena mutacemi v konzervovaných motivech (Copeland, et al.; 2003). Dnes převládá názor, že hlavní příčinou je zastavování či prokluzování PolG v těžkých oblastech jako jsou homopolymerní úseky, repetice mikrosatelitního typu atd. (Wanrooij, et al.; 2004).

Již bylo dokázáno, že mnoho mitochondriálních dysfunkcí vzniká během stárnutí ve tkáních, které mají vysoké energetické nároky jako srdce a kosterní svaly, játra a mozek (Chabi, et al.; 2005). Tyto defekty poškozují produkci ATP během oxidativní fosforylace. Nedávno bylo zjištěno, že během stárnutí vzniká velké množství náhodně deletovaných molekul mtDNA (60-70 % u pacientů nad 80 let), přičemž „časté“ delece z nich tvoří jen velmi malou část (Chabi, et al.; 2005).

8. Nukleotidový metabolismus a jeho poruchy

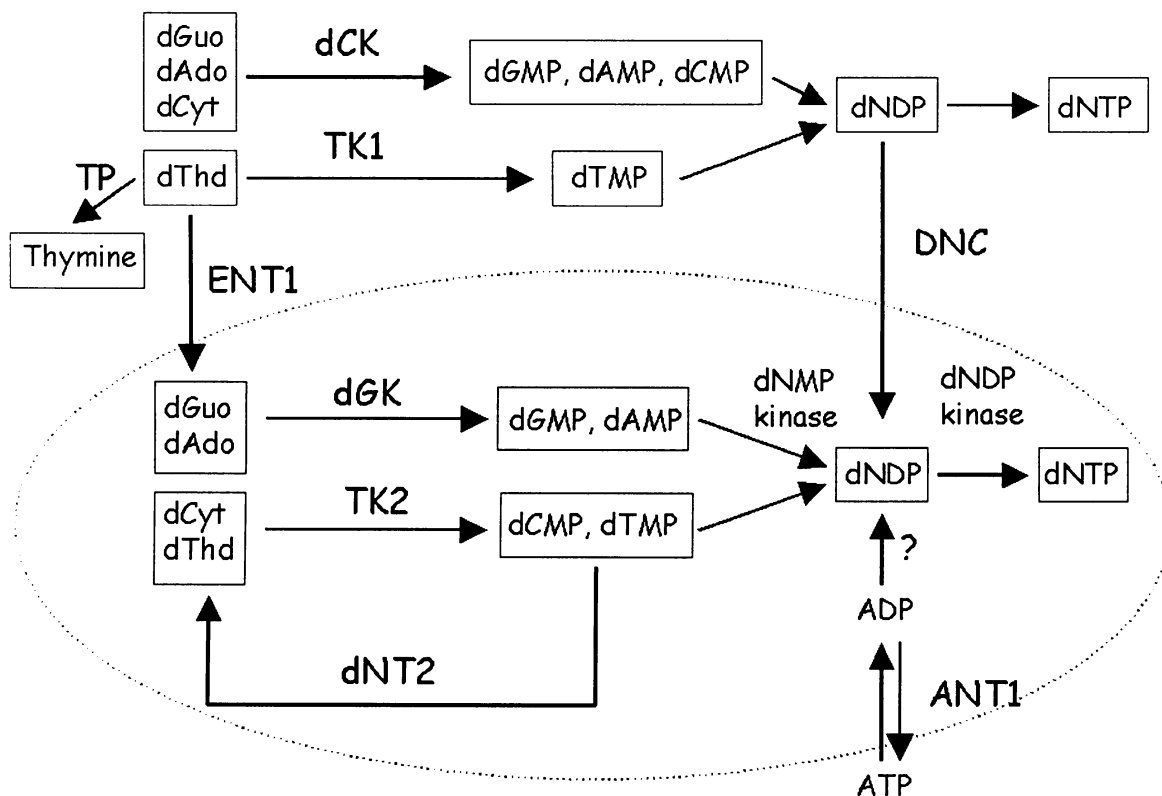
Porucha některého enzymu nukleotidového metabolismu vede k nerovnováze mitochondriálního deoxynukleosidtrifosfátového (dNTP) poolu a pravděpodobně přispívá ke spontánní mutagenezi mitochondriálního genomu a rozvoji mnoha lidských onemocnění (Song, et al.; 2005).

Deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTPs) jsou stavebními kameny syntézy jaderné i mitochondriální DNA. Dělicí se buňky replikují nDNA pouze v S-fázi buněčného cyklu, při kterém jsou dNTPs syntetizovány *de novo* v cytosolu (Reichard; 1988). V klidových buňkách k replikaci nDNA nedochází nebo jen výjimečně a syntéza dNTPs v cytosolu téměř neprobíhá. Naopak syntéza mtDNA probíhá nezávisle na buněčném cyklu a o její regulaci je známo jen velmi málo (Kornberg, et al.; 1992). Oba tyto procesy vyžadují vyrovnaný přísun všech typů dNTPs, přičemž mitochondriální dNTP pool v matrix je od cytosolického oddělen vysoce nepropustnou vnitřní mitochondriální membránou (Bestwick and Mathews; 1982).

Na základě momentálního stavu buňky, resp. tkáně ve které se nachází, se výrazně liší způsob, kterým jsou dNTPs do mitochondrií transportovány. V dělicích se buňkách, ve kterých probíhá replikace nDNA, je většina dNTPs syntetizována *de novo* v cytosolu, kde jsou přítomny i deoxynukleosidkinázy: thymidinkináza 1 (TK1) a deoxycytidinkináza (dCK), které katalyzují fosforylaci deoxynukleosidů za vzniku deoxynukleosid monofosfátů (Elpeleg; 2003). Do matrix jsou transportovány přes vnitřní mitochondriální membránu ve formě dNDPs deoxynukleotidovým přenašečem (DNC) (Dolce, et al.; 2001). Nukleosid-difosfátkinázy katalyzují připojení posledního fosfátu za vzniku dNTPs, které jsou již přímo využívány polymerázou γ k syntéze mtDNA (Ferraro, et al.; 2005) (viz. obr. 6).

V klidových buňkách je výrazně omezena *de novo* syntéza dNTPs v cytosolu a mitochondrie jsou tak závislé na příjmu deoxynukleosidů. Deoxynukleosidy pocházejí z extracelulární tekutiny nebo degradace nukleotidů a do matrix jsou transportovány přes rovnovážný nukleosidový přenašeč 1 (ENT1) (Rampazzo, et al.; 2004). Deoxypuriny jsou zde fosforylovány deoxyguanosinkinázou (dGK) a deoxypyrimidiny thymidinkinázou 2 (TK2) (Wang, et al.; 1999) (viz. obr. 6).

V cytosolu se nachází ještě jeden důležitý enzym, thymidinfosforyláza (TP) (Brown and Bicknell; 1998). Tento enzym katalyzuje nevratnou přeměnu thymidinu a deoxyuridinu na thymin a uridin, které jsou následně katabolizovány (Elpeleg; 2003) (viz. obr. 6).



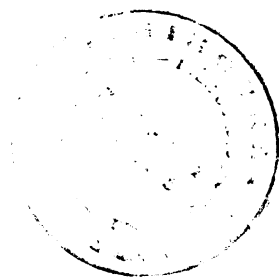
Obr.6.: Schéma procesu syntézy a transportu deoxynukleotidů mezi cytosolem a matrix mitochondrií (upraveno podle (Elpeleg; 2003))

Mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatie (MNGIE) je autosomálně recesivní porucha, kde ztráta aktivity thymidinfosforylázy (TP) vede vzniku delecí a bodových mutací v mtDNA (Spinazzola, et al.; 2002).

Mutace v genu pro thymidinkinázu 2 (TK2) jsou příčinou izolované myopatie a redukce mtDNA ve svalech (Saada, et al.; 2001). Ztráta TK2 způsobuje snížení množství dTTP (dCTP) pro mtDNA replikaci vedoucí k redukcí celkového obsahu mtDNA v buňce (deplece). Podobné následky má i porucha deoxyguanosinkinázy (dGK) (Ferraro, et al.; 2005).

Jednou z příčin progresivní externí oftalmoplegie (PEO) je porucha adeninnukleotidového translokátoru 1 (ANT1), který je hlavním ADP/ATP přenašečem vnitřní mitochondriální membrány ve svalech a srdci (Kaukonen, et al.; 2000). Nejčastější příčinou autosomálně dominantní PEO (adPEO) s delecemi mtDNA jsou dominantní mutace v genu ANT1 na chromozomu 4q35. Nedávno byla objevena recesivní mutace v tomto genu vedoucí k násobným delecím mtDNA ve svalech a rozvoji hypertrofické kardiomyopatie (Palmieri, et al.; 2005).

Mutace v genu pro deoxynukleotidový přenašeč způsobuje mikrocefálii u populace Amishů v Pensylvánii (MCPHA). Aminokyselinová substituce způsobí ztrátu schopnosti DNC přenášet deoxynukleotidy přes vnitřní mitochondriální membránu. Podle Rosenberga a kolektiv je deoxynukleotidový transport esenciální pro prenatální vývoj mozku, jehož porucha vede k MCPHA (Rosenberg, et al.; 2002).



9. Myší modely mitochondriálních onemocnění

Pro studium onemocnění spojených poruchou replikace mtDNA jsou dnes využívány některé myší modely. Byly vytvořeny myší linie s cíleně mutovanou exonukleázovou aktivitou PolG, linie s mutací v mtDNA helikáze Twinkle a ANT1 knock-out myši.

9.1. Modely funkce DNA-polymerázy γ

V roce 2004 vytvořila skupina A. Trifunovic linii homozygotních knock-in myší, které exprimovaly katalytickou podjednotku PolG s nefunkční exonukleázovou proofreadingovou aktivitou. Proofreadingová aktivita byla cíleně mutována ve druhé exonukleázové doméně substitucí alaninu namísto esenciálního aspartátu (D257A). Tato dysfunkce PolG byla příčinou akumulace bodových mutací (v mozku, srdci a játrech) a zvýšení množství deletovaných mtDNA. Fenotypovým projevem byla zkrácená délka života, předčasné stárnutí, redukce podkožního tuku, ztráta srsti, šednutí, kyfóza, osteoporóza, anémie a redukce plodnosti (Trifunovic, et al.; 2004).

Stejnou mutací (D257A) použila i skupina G. C. Kujotha v roce 2005 pro studium předčasného stárnutí a apoptózy. Kromě poruch zmíněných předchozí skupinou byly u těchto myší zjištěny další s akumulací mutací spojené poruchy: s věkem spojená ztráta sluchu, s věkem spojená ztráta svalové hmoty a indukce apoptózy způsobující stárnutí a dysfunkci tkání. D257A mutace se neprojevila zvýšením oxidativního stresu v mitochondriích ani zvýšenou produkcí reaktivních kyslíkových radikálů (ROS – reactive oxygen species) (Kujoth, et al.; 2005).

9.2. Model funkce mtDNA-helikázy Twinkle

V roce 2005 byl vytvořen myší model pro studium mitochondriálních onemocnění s nástupem v dospělosti. Transgenní myši nesly lidskou PEO mutaci A360T nebo duplikaci aminokyselin 353 – 365. Mnohočetné delece akumulované v tkáních těchto myší zapříčinily zhoršování funkce dýchacího řetězce a pozdější nástup mitochondriálních onemocnění. Nebyl pozorován fenotyp předčasného stárnutí (Tyynismaa, et al.; 2005).

9.3. Model funkce ANT1

B. H. Graham a kolektiv vytvořil v roce 1997 knock-out myši postrádající srdeční/svalovou izoformu ANT1. Histologické a ultrastrukturní zkoušky kostních svalů těchto mutantů odhalily „ragged-red“ svalová vlákna a zvýšenou proliferaci mitochondrií s vážnou poruchou dýchání. Analýza srdeční tkáně odhalila rozvoj hypertrofické kardiomyopatie s mitochondriální proliferací (Graham, et al.; 1997).

H. Yin a kolektiv vytvořily knock-out myši pro studium chronické progresivní externí oftalmoplegie (CPEO). Zaměřili se na poškození extraokulárních svalů (EOM), kde byla nalezena mitochondriální myopatie se zvýšeným počtem i velikostí mitochondrií. Stejně poruchy jsou typické i pro lidské pacienty s CPEO (Yin, et al.; 2005).

10. Cíle další práce

V další práci bych se chtěla zaměřit na studium vztahu mezi rozsáhlými delecemi v mtDNA a funkcí systému oxidativní fosforylace u pacientů, u kterých byla delece mtDNA nalezena ve vzorku svalové biopsie. Hlavním cílem by mělo být studium dopadu mtDNA delece na složení, množství a aktivitu komplexů dýchacího řetězce, popřípadě klinický fenotyp, dále pak kvantifikace množství deletovaných mtDNA molekul ve studovaných vzorcích. V případě, že u pacienta vznikne podezření na autosomální dědičnost, budou analyzovány kandidátní geny spojené s výskytem mtDNA delecí.

Kvantifikace podílu deletovaných mtDNA bude zjištěna pomocí kvantitativního real-time PCR. Exony kandidátních genů budou pomocí specifických primerů amplifikovány a sekvenovány metodou cyklického sekvenování. Aktivity jednotlivých komplexů dýchacího řetězce budou stanoveny spektrofotometricky. Proteinové složení komplexů dýchacího řetězce v izolovaných svalových mitochondriích bude studováno pomocí dvourozměrné elektroforézy a metodou Western blotu.

11. Závěr

Mitochondriální poruchy jsou velmi vážná onemocnění, která se mohou objevit v kterémkoli věku od novorozeneckého období až do dospělosti, ale mohou se projevit i ve vysokém stáří. Prognóza těchto onemocnění až na některé výjimky není příznivá a léčba je pouze symptomatická.

Na vzniku delecí v mtDNA se podílí celá řada endogenních i exogenních faktorů. Studium povahy vzniku delecí mtDNA a jejich funkčního dopadu na energetický metabolismu buňky představuje významnou oblast bioenergetického výzkumu, jehož ožřejmění může nejen významně zlepšit genetické poradenství u postižených rodin, ale výhledově i dosud špatnou prognózu pacientů.

12. Seznam literatury

- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J., Staden, R. and Young, I. G. (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, **290**, 457-465
- Bestwick, R. K. and Mathews, C. K. (1982) Unusual compartmentation of precursors for nuclear and mitochondrial DNA in mouse L cells. *J Biol Chem*, **257**, 9305-9308
- Bogenhagen, D. F. and Clayton, D. A. (2003) The mitochondrial DNA replication bubble has not burst. *Trends Biochem Sci*, **28**, 357-360
- Bowmaker, M., Yang, M. Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Jacobs, H. T., Huberman, J. A. and Holt, I. J. (2003) Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem*, **278**, 50961-50969
- Brewer, B. J. and Fangman, W. L. (1988) A replication fork barrier at the 3' end of yeast ribosomal RNA genes. *Cell*, **55**, 637-643
- Brown, N. S. and Bicknell, R. (1998) Thymidine phosphorylase, 2-deoxy-D-ribose and angiogenesis. *Biochem J*, **334 (Pt 1)**, 1-8
- Brown, T. A., Cecconi, C., Tkachuk, A. N., Bustamante, C. and Clayton, D. A. (2005) Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes Dev*, **19**, 2466-2476
- Cantatore, P., Flagella, Z., Fracasso, F., Lezza, A. M., Gadaleta, M. N. and de Montalvo, A. (1987) Synthesis and turnover rates of four rat liver mitochondrial RNA species. *FEBS Lett*, **213**, 144-148
- Carrodeguas, J. A., Theis, K., Bogenhagen, D. F. and Kisker, C. (2001) Crystal structure and deletion analysis show that the accessory subunit of mammalian DNA polymerase gamma, Pol gamma B, functions as a homodimer. *Mol Cell*, **7**, 43-54
- Carroll, J., Fearnley, I. M., Shannon, R. J., Hirst, J. and Walker, J. E. (2003) Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics*, **2**, 117-126
- Cerritelli, S. M., Frolova, E. G., Feng, C., Grinberg, A., Love, P. E. and Crouch, R. J. (2003) Failure to produce mitochondrial DNA results in embryonic lethality in Rnaseh1 null mice. *Mol Cell*, **11**, 807-815
- Clayton, D. A. (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, **28**, 693-705
- Copeland, W. C., Ponamarev, M. V., Nguyen, D., Kunkel, T. A. and Longley, M. J. (2003) Mutations in DNA polymerase gamma cause error prone DNA synthesis in human mitochondrial disorders. *Acta Biochim Pol*, **50**, 155-167
- Dairaghi, D. J., Shadel, G. S. and Clayton, D. A. (1995) Addition of a 29 residue carboxyl-terminal tail converts a simple HMG box-containing protein into a transcriptional activator. *J Mol Biol*, **249**, 11-28

- Dolce, V., Fiermonte, G., Runswick, M. J., Palmieri, F. and Walker, J. E. (2001) The human mitochondrial deoxynucleotide carrier and its role in the toxicity of nucleoside antivirals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 2284-2288
- Elpeleg, O. (2003) Inherited mitochondrial DNA depletion. *Pediatr Res*, **54**, 153-159
- Fan, L. and Kaguni, L. S. (2001) Multiple regions of subunit interaction in *Drosophila* mitochondrial DNA polymerase: three functional domains in the accessory subunit. *Biochemistry*, **40**, 4780-4791
- Ferraro, P., Pontarin, G., Crocco, L., Fabris, S., Reichard, P. and Bianchi, V. (2005) Mitochondrial deoxynucleotide pools in quiescent fibroblasts: a possible model for mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy (MNGIE). *J Biol Chem*, **280**, 24472-24480
- Fish, J., Raule, N. and Attardi, G. (2004) Discovery of a major D-loop replication origin reveals two modes of human mtDNA synthesis. *Science*, **306**, 2098-2101
- Frey, T. G., Renken, C. W. and Perkins, G. A. (2002) Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochim Biophys Acta*, **1555**, 196-203
- Ghivizzani, S. C., Madsen, C. S., Nelen, M. R., Ammini, C. V. and Hauswirth, W. W. (1994) In organello footprint analysis of human mitochondrial DNA: human mitochondrial transcription factor A interactions at the origin of replication. *Mol Cell Biol*, **14**, 7717-7730
- Graham, B. H., Waymire, K. G., Cottrell, B., Trounce, I. A., MacGregor, G. R. and Wallace, D. C. (1997) A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet*, **16**, 226-234
- Grohmann, K., Amairic, F., Crews, S. and Attardi, G. (1978) Failure to detect "cap" structures in mitochondrial DNA-coded poly(A)-containing RNA from HeLa cells. *Nucleic Acids Res*, **5**, 637-651
- Hess, J. F., Parisi, M. A., Bennett, J. L. and Clayton, D. A. (1991) Impairment of mitochondrial transcription termination by a point mutation associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature*, **351**, 236-239
- Holt, I. J., Lorimer, H. E. and Jacobs, H. T. (2000) Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell*, **100**, 515-524
- Chabi, B., de Camaret, B. M., Chevrollier, A., Boisgard, S. and Stepien, G. (2005) Random mtDNA deletions and functional consequence in aged human skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, **332**, 542-549
- Chang, D. D., Hauswirth, W. W. and Clayton, D. A. (1985) Replication priming and transcription initiate from precisely the same site in mouse mitochondrial DNA. *Embo J*, **4**, 1559-1567
- Chen, X. J. and Butow, R. A. (2005) The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet*, **6**, 815-825
- Chinnery, P. F., Johnson, M. A., Wardell, T. M., Singh-Kler, R., Hayes, C., Brown, D. T., Taylor, R. W., Bindoff, L. A. and Turnbull, D. M. (2000) The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann Neurol*, **48**, 188-193

- Kaguni, L. S. (2004) DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem*, **73**, 293-320
- Kasamatsu, H. and Vinograd, J. (1974) Replication of circular DNA in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*, **43**, 695-719
- Kaukonen, J., Juselius, J. K., Tiranti, V., Kyttala, A., Zeviani, M., Comi, G. P., Keranen, S., Peltonen, L. and Suomalainen, A. (2000) Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance. *Science*, **289**, 782-785
- Kelly, J. L. and Lehman, I. R. (1986) Yeast mitochondrial RNA polymerase. Purification and properties of the catalytic subunit. *J Biol Chem*, **261**, 10340-10347
- Korhonen, J. A., Gaspari, M. and Falkenberg, M. (2003) TWINKLE Has 5' -> 3' DNA helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *J Biol Chem*, **278**, 48627-48632
- Kornberg, A., Francis, C. W. and Marder, V. J. (1992) Plasma crosslinked fibrin polymers: quantitation based on tissue plasminogen activator conversion to D-dimer and measurement in normal and patients with acute thrombotic disorders. *Blood*, **80**, 709-717
- Kruse, B., Narasimhan, N. and Attardi, G. (1989) Termination of transcription in human mitochondria: identification and purification of a DNA binding protein factor that promotes termination. *Cell*, **58**, 391-397
- Kujoth, G. C., Hiona, A., Pugh, T. D., Someya, S., Panzer, K., Wohlgemuth, S. E., Hofer, T., Seo, A. Y., Sullivan, R., Jobling, W. A., Morrow, J. D., Van Remmen, H., Sedivy, J. M., Yamasoba, T., Tanokura, M., Weindruch, R., Leeuwenburgh, C. and Prolla, T. A. (2005) Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science*, **309**, 481-484
- Lakshmiopathy, U. and Campbell, C. (2001) Antisense-mediated decrease in DNA ligase III expression results in reduced mitochondrial DNA integrity. *Nucleic Acids Res*, **29**, 668-676
- Larsson, N. G., Wang, J., Wilhelmsson, H., Oldfors, A., Rustin, P., Lewandoski, M., Barsh, G. S. and Clayton, D. A. (1998) Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet*, **18**, 231-236
- Lee, D. Y. and Clayton, D. A. (1997) RNase mitochondrial RNA processing correctly cleaves a novel R loop at the mitochondrial DNA leading-strand origin of replication. *Genes Dev*, **11**, 582-592
- Lewis, D. L., Farr, C. L., Wang, Y., Lagina, A. T., 3rd and Kaguni, L. S. (1996) Catalytic subunit of mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila* embryos. Cloning, bacterial overexpression, and biochemical characterization. *J Biol Chem*, **271**, 23389-23394
- Li, K., Smagula, C. S., Parsons, W. J., Richardson, J. A., Gonzalez, M., Hagler, H. K. and Williams, R. S. (1994) Subcellular partitioning of MRP RNA assessed by ultrastructural and biochemical analysis. *J Cell Biol*, **124**, 871-882
- Li, K. and Williams, R. S. (1997) Tetramerization and single-stranded DNA binding properties of native and mutated forms of murine mitochondrial single-stranded DNA-binding proteins. *J Biol Chem*, **272**, 8686-8694

- Longley, M. J., Prasad, R., Srivastava, D. K., Wilson, S. H. and Copeland, W. C. (1998) Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 12244-12248
- Lygerou, Z., Allmang, C., Tollervey, D. and Seraphin, B. (1996) Accurate processing of a eukaryotic precursor ribosomal RNA by ribonuclease MRP in vitro. *Science*, **272**, 268-270
- Mita, S., Rizzuto, R., Moraes, C. T., Shanske, S., Arnaudo, E., Fabrizi, G. M., Koga, Y., DiMauro, S. and Schon, E. A. (1990) Recombination via flanking direct repeats is a major cause of large-scale deletions of human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*, **18**, 561-567
- Montoya, J., Gaines, G. L. and Attardi, G. (1983) The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell*, **34**, 151-159
- Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M. and Attardi, G. (1982) Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 7195-7199
- Moraes, C. T., DiMauro, S., Zeviani, M., Lombes, A., Shanske, S., Miranda, A. F., Nakase, H., Bonilla, E., Werneck, L. C., Servidei, S. and et al. (1989) Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med*, **320**, 1293-1299
- Murphy, W. I., Attardi, B., Tu, C. and Attardi, G. (1975) Evidence for complete symmetrical transcription in vivo of mitochondrial DNA in HeLa cells. *J Mol Biol*, **99**, 809-814
- Ojala, D., Montoya, J. and Attardi, G. (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, **290**, 470-474
- Olson, M. W., Wang, Y., Elder, R. H. and Kaguni, L. S. (1995) Subunit structure of mitochondrial DNA polymerase from *Drosophila* embryos. Physical and immunological studies. *J Biol Chem*, **270**, 28932-28937
- Palmieri, L., Alberio, S., Pisano, I., Lodi, T., Meznaric-Petrusa, M., Zidar, J., Santoro, A., Scarcia, P., Fontanesi, F., Lamantea, E., Ferrero, I. and Zeviani, M. (2005) Complete loss-of-function of the heart/muscle-specific adenine nucleotide translocator is associated with mitochondrial myopathy and cardiomyopathy. *Hum Mol Genet*, **14**, 3079-3088
- Pinz, K. G. and Bogenhagen, D. F. (1998) Efficient repair of abasic sites in DNA by mitochondrial enzymes. *Mol Cell Biol*, **18**, 1257-1265
- Rampazzo, C., Ferraro, P., Pontarin, G., Fabris, S., Reichard, P. and Bianchi, V. (2004) Mitochondrial deoxyribonucleotides, pool sizes, synthesis, and regulation. *J Biol Chem*, **279**, 17019-17026
- Reichard, P. (1988) Interactions between deoxyribonucleotide and DNA synthesis. *Annu Rev Biochem*, **57**, 349-374
- Rosenberg, M. J., Agarwala, R., Bouffard, G., Davis, J., Fiermonte, G., Hilliard, M. S., Koch, T., Kalikin, L. M., Makalowska, I., Morton, D. H., Petty, E. M., Weber, J. L., Palmieri, F., Kelley, R. I., Schaffer, A. A. and Biesecker, L. G. (2002) Mutant deoxynucleotide carrier is associated with congenital microcephaly. *Nat Genet*, **32**, 175-179
- Rossignol, R., Faustin, B., Rocher, C., Malgat, M., Mazat, J. P. and Letellier, T. (2003) Mitochondrial threshold effects. *Biochem J*, **370**, 751-762

- Saada, A., Shaag, A., Mandel, H., Nevo, Y., Eriksson, S. and Elpeleg, O. (2001) Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy. *Nat Genet*, **29**, 342-344
- Samuels, D. C., Schon, E. A. and Chinnery, P. F. (2004) Two direct repeats cause most human mtDNA deletions. *Trends Genet*, **20**, 393-398
- Servidei, S. (2003) Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. *Neuromuscul Disord*, **13**, 848-853
- Shadel, G. S. (1999) Yeast as a model for human mtDNA replication. *Am J Hum Genet*, **65**, 1230-1237
- Shadel, G. S. and Clayton, D. A. (1997) Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates. *Annu Rev Biochem*, **66**, 409-435
- Schaefer, A., Blakely, E., Hayes, C., McFarland, R., Chinnery, P., Taylor, R., Turnbull, D. (2004) Mitochondrial disease: new prevalence figures with major resource implications. *Biochim Biophys Acta*, **1657**, 34
- Schon, E. A. (2000) Mitochondrial genetics and disease. *Trends Biochem Sci*, **25**, 555-560
- Solano, A., Gamez, J., Carod, F. J., Pineda, M., Playan, A., Lopez-Gallardo, E., Andreu, A. L. and Montoya, J. (2003) Characterisation of repeat and palindrome elements in patients harbouring single deletions of mitochondrial DNA. *J Med Genet*, **40**, e86
- Song, S., Pursell, Z. F., Copeland, W. C., Longley, M. J., Kunkel, T. A. and Mathews, C. K. (2005) DNA precursor asymmetries in mammalian tissue mitochondria and possible contribution to mutagenesis through reduced replication fidelity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 4990-4995
- Spees, J. L., Olson, S. D., Whitney, M. J. and Prockop, D. J. (2006) Mitochondrial transfer between cells can rescue aerobic respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 1283-1288
- Spelbrink, J. N., Li, F. Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q. P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L., Santoro, L., Toscano, A., Fabrizi, G. M., Somer, H., Croxen, R., Beeson, D., Poulton, J., Suomalainen, A., Jacobs, H. T., Zeviani, M. and Larsson, C. (2001) Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet*, **28**, 223-231
- Spinazzola, A., Marti, R., Nishino, I., Andreu, A. L., Naini, A., Tadesse, S., Pela, I., Zammarchi, E., Donati, M. A., Oliver, J. A. and Hirano, M. (2002) Altered thymidine metabolism due to defects of thymidine phosphorylase. *J Biol Chem*, **277**, 4128-4133
- Taanman, J. W. (1999) The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta*, **1410**, 103-123
- Tapper, D. P. and Clayton, D. A. (1981) Mechanism of replication of human mitochondrial DNA. Localization of the 5' ends of nascent daughter strands. *J Biol Chem*, **256**, 5109-5115
- Thommes, P., Farr, C. L., Marton, R. F., Kaguni, L. S. and Cotterill, S. (1995) Mitochondrial single-stranded DNA-binding protein from *Drosophila* embryos. Physical and biochemical characterization. *J Biol Chem*, **270**, 21137-21143
- Tiranti, V., Rocchi, M., DiDonato, S. and Zeviani, M. (1993) Cloning of human and rat cDNAs encoding the mitochondrial single-stranded DNA-binding protein (SSB). *Gene*, **126**, 219-225

- Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J. N., Rovio, A. T., Bruder, C. E., Bohlooly, Y. M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., Tornell, J., Jacobs, H. T. and Larsson, N. G. (2004) Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*, **429**, 417-423
- Tyynismaa, H., Mjosund, K. P., Wanrooij, S., Lappalainen, I., Ylikallio, E., Jalanko, A., Spelbrink, J. N., Paetau, A. and Suomalainen, A. (2005) Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 17687-17692
- Tyynismaa, H., Sembongi, H., Bokori-Brown, M., Granycome, C., Ashley, N., Poulton, J., Jalanko, A., Spelbrink, J. N., Holt, I. J. and Suomalainen, A. (2004) Twinkle helicase is essential for mtDNA maintenance and regulates mtDNA copy number. *Hum Mol Genet*, **13**, 3219-3227
- Van de Graaff, K. M., Fox, S. I., Lafleur, K. M. (1997) Synopsis of Human Anatomy and Physiology. *Wm. C. Brown Publishers, USA*
- Walberg, M. W. and Clayton, D. A. (1981) Sequence and properties of the human KB cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*, **9**, 5411-5421
- Wallace, D. C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, **283**, 1482-1488
- Wang, L., Munch-Petersen, B., Herrstrom Sjoberg, A., Hellman, U., Bergman, T., Jornvall, H. and Eriksson, S. (1999) Human thymidine kinase 2: molecular cloning and characterisation of the enzyme activity with antiviral and cytostatic nucleoside substrates. *FEBS Lett*, **443**, 170-174
- Wang, Y., Lyu, Y. L. and Wang, J. C. (2002) Dual localization of human DNA topoisomerase IIIalpha to mitochondria and nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12114-12119
- Wanrooij, S., Luoma, P., van Goethem, G., van Broeckhoven, C., Suomalainen, A. and Spelbrink, J. N. (2004) Twinkle and POLG defects enhance age-dependent accumulation of mutations in the control region of mtDNA. *Nucleic Acids Res*, **32**, 3053-3064
- Wong, T. W. and Clayton, D. A. (1985a) In vitro replication of human mitochondrial DNA: accurate initiation at the origin of light-strand synthesis. *Cell*, **42**, 951-958
- Yang, C., Curth, U., Urbanke, C. and Kang, C. (1997) Crystal structure of human mitochondrial single-stranded DNA binding protein at 2.4 Å resolution. *Nat Struct Biol*, **4**, 153-157
- Yang, M. Y., Bowmaker, M., Reyes, A., Vergani, L., Angeli, P., Gringeri, E., Jacobs, H. T. and Holt, I. J. (2002) Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell*, **111**, 495-505
- Yasukawa, T., Yang, M. Y., Jacobs, H. T. and Holt, I. J. (2005) A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Mol Cell*, **18**, 651-662
- Yin, H., Stahl, J. S., Andrade, F. H., McMullen, C. A., Webb-Wood, S., Newman, N. J., Biousse, V., Wallace, D. C. and Pardue, M. T. (2005) Eliminating the Ant1 isoform produces a mouse with CPEO pathology but normal ocular motility. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **46**, 4555-4562
- Zhang, H., Barcelo, J. M., Lee, B., Kohlhagen, G., Zimonjic, D. B., Popescu, N. C. and Pommier, Y. (2001) Human mitochondrial topoisomerase I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10608-10613